

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791837

研究課題名（和文）不妊治療の分子標的治療をめざした STAT3 活性化のための標的分子候補の検索

研究課題名（英文）Investigation of progesterone and STAT3 signal transduction.

研究代表者

中村 仁美 (HITOMI NAKAMURA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80467571

研究成果の概要（和文）：

現在の不妊治療において、着床不全の治療方法を確立する事が求められている。しかし、現状としてはいまだその病態だけでなく、生理的着床現象の物質的基盤ですら明らかではない。我々のこれまでの検討において、STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) 活性が重要である事、これまでのプロゲステロン補充による治療では不十分であったその不足分が STAT3 活性である事が示唆された。そこで、プロゲステロン-プロゲステロンレセプターから STAT3 活性までのシグナル伝達についての基礎検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

In current infertility treatment, it is necessary to establish new methods for treatment and diagnosis of implantation failure. However, the pathophysiology of implantation failure is unexplained as is the molecular mechanism of implantation. our current studies suggested that STAT3 could be a useful target for therapy of implantation failure. In this study, we investigated the signal transduction between progesterone-progesterone receptor and STAT3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：着床不全・不妊症、プロゲステロン、STAT3

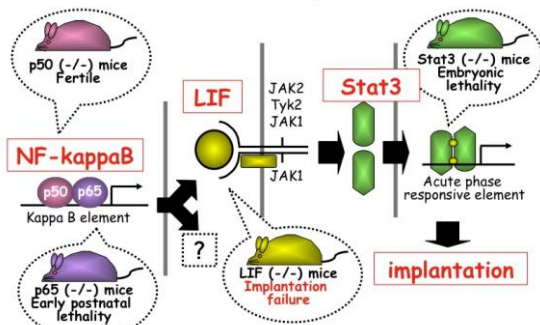
1. 研究開始当初の背景

現在の不妊治療において、①排卵、②受精までは何らかの診断方法および治療方法があるのにもかかわらず、妊娠におけるその次の過程である③着床については、診断方法も治療方法もないのが現状である。現在、多くの原因不明の不妊症が、着床不全によるものと考えられているが、その病態は未だ解明されていない。それだけでなく、生理的な着床現象の物質的基盤も解明されていないのが現状である。

我々は、HVJ-E vector を用いて、マウス子宮

局所における一過性遺伝子導入方法を開発した。そして、これを用いて子宮内膜における NF- κ B 活性が一部 LIF を介して着床のタイミングを制御している事を明らかにした。さらに LIF シグナルによって活性化される STAT3 について、子宮局所の STAT-3 活性を 50%抑制する事により、ホルモンレベルは正常であるにもかかわらず着床不全をおこすという、ヒト原因不明の不妊症でよくみられる状態をマウスで再現する事に成功した。

Molecular mechanism of implantation in mouse



臨床的に子宮の着床能は血中プロゲステロンレベルの測定および超音波における子宮内膜の厚さの測定によっておこなわれている。しかしながら、この二つのパラメーターにおいて問題がないにもかかわらず妊娠に至らない症例があまりに多い。

黄体補充療法としてプロゲステロンの補充が一般的に行われており、プロゲステロンの作用が着床に不可欠である事に疑いはない。しかしながら、体外受精治療周期において採卵日から+12日目(胚移植から10日目)におけるプロゲステロンレベルは妊娠した群では有意に高値を示したが、それ以前、つまり着床期のプロゲステロンレベルでは妊娠・非妊娠両群間に差がないという報告がある(Noyes, N. et al, Fertil Steril, 2001, 76:92-7., Vlasisavljevic, V. et al., Ultrasound Obstet Gynecol, 2001, 17:239-44.)。我々の検討においても黄体中期におけるプロゲステロンレベルに両群間に差がなかった。同時に行った子宮内膜におけるSTAT3に関して、妊娠に至った症例では、子宮内膜においてSTAT3およびリン酸化STAT3の染色性を認めたが、着床不全によって妊娠に至らなかったと考えられた症例においてはSTAT3およびリン酸化STAT3の染色性が認められなかった(未発表データ)。これら結果よりprogesteroneの作用は不可欠であるが、それだけでは不足であり、その不足分がSTAT3活性であり、STAT-3が着床不全の診断および治療の分子標的と成り得る事が示唆された。

我々のグループでは、これまでHVJ-Eベクターを用いた検討で妊娠に関わる病態に関して、いくつかの分子を同定してきた。これをさらに実現化するために、現在子宮局所に対するdrug delivery system (DDS)を開発中である。そこで、このDDSを用いて着床不全不妊症の治療法として、子宮内膜上皮細胞のSTAT3活性化を最終目的とした、子宮局所に対する分子標的医薬作成を着想した。しかしながら、STAT3は転写因子であり不安定な活性化STAT3そのものをDDSに内包する事は困難か

と考えた。

そこで、STAT3を直接ではなく、progesterone-PRから、STAT3活性化までのシグナル伝達物質を分子標的とした着床不全不妊症治療戦略を考えるに至った。活性化STAT3にくらべprogesterone-PRからSTAT3活性化までの過程の安定した分子を内包した子宮に対するDDSの方が、具体的な創薬の観点からもより現実的であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、子宮局所におけるprogesterone-PRからSTAT3のシグナル伝達についての基礎的な検討をする事を目的とした。この検討により、将来の着床不全不妊症に対する子宮局所における分子標的医薬の開発への礎とする。

3. 研究の方法

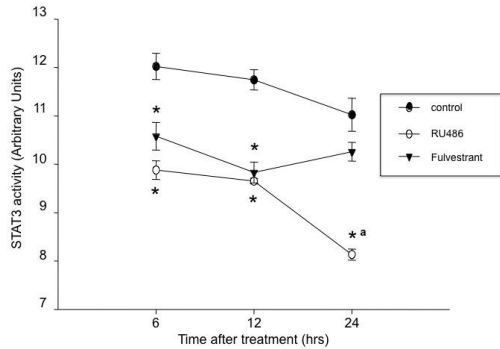
STAT3活性を標的分子とした着床不全不妊症の治療戦略として、progesterone-PRからSTAT3活性化までの過程の中に分子標的治療に応用可能な分子の検索を行った。本研究では、着床期子宮におけるprogesterone-PRからSTAT3活性化までのシグナル伝達についての基礎検討を目的とした。

この目的を遂行するために、まずin-vitroの系において、シグナル伝達の検討を行った。その結果同定された分子に関して、decoyまたはdominant negativeによる抑制する系および過剰発現系をマウス子宮局所における一過性遺伝子導入システムを用いてマウス子宮内膜に対して確立し、子宮における生理的機能解析を行った。

4. 研究成果

これまでの検討から、STAT3活性を着床期子宮局所で50%だけ、一過性に抑制すると、プロゲステロンの作用非依存的に着床不全が起こる事を確認している。この事からSTAT3活性がprogesteroneの作用と独立している、もしくはSTAT3活性が下流にある事が示唆された。

そこで、着床期マウスにPR antagonistであるmifepristone (RU486)およびselective estrogen receptor down-regulatorであるfulvestrantを投与し、その後子宮を摘出し、核蛋白を抽出してSTAT3活性について検討を行った。するとRU486およびfulvestrant投与によりSTAT3活性が抑制される事が示された。この事から、子宮において、progesterone-PRがSTAT3活性を制御している事が示唆された。



マウスにおいて胚と子宮が同期化おらず、通常は妊娠に至らない発情前期に HVJ-E ベクターを用いて子宮内膜上皮細胞の STAT3 の活性化を誘導するために、STAT3 の constitutively active form である STAT3C expression plasmid DNA をマウス子宮に導入し、導入後胚移植を行った。コントロールとして luciferase 強制発現ベクターを導入したグループでは、これまでの知見の通り、着床部位は認められなかった。これに対して、STAT3C 強制発現ベクターを導入した軍では着床現象が認められた。この結果より、STAT3 はその活性を抑制する事により着床に阻害的に働くだけでなく、STAT3 を強制発現する事により着床現象に促進的に働く事が示された。

この発情前期の時期には、プロゲステロンの発現はほとんどなく、その環境下において、STAT3C を強制発現する事により着床現象が促進された事、プロゲステロンレセプターアンタゴニストの添加により STAT3 活性が抑制された事から、STAT3 はプロゲステロン-プロゲステロンレセプターの下流に存在する事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Nguyen, T. M., Kumasawa, K., Tsutsui, T., Nakamura, H., Masaki, H., Ono, T., Kimura, T. **Overexpression of Endogenous TIMP-2 Increase the Proliferation of BeWo Choriocarcinoma Cells Through the MAPK-Signaling Pathway.** *Reprod Sci* (in press)
2. Nguyen, T. M., Nakamura, H., Wakabayashi, A., Kanagawa, T., Koyama, S., Tsutsui, T., Hamasaki, T., Kimura, T. (2012) **Estimation of mouse fetal weight by ultrasonography: application from clinic to laboratory.** *Lab Anim.* 46:225-230.
3. Nakamura, H., Jasper, M. J., Hull, M. L., Aplin, J. D., Robertson, S. A. (2012) **Macrophages regulate expression of alpha**

1,2-fucosyltransferase genes in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 18:204-215.

[学会発表] (計 13 件)

1. Nakamura, H., Jasper, M. J., Masaki, H., Koyama, S., Kumasawa, K., Tsutsui, T., Robertson, S. A., Kimura, T. (2012) **Modelling uterine macrophage-epithelial cell communication in vitro using peripheral blood monocytes.** 13th International Symposium for Immunology of Reproduction. Varna, Bulgaria 6.22-24/12
2. Kumasawa, K., Nakamura, H., Matsuzaki, T., Masaki, H., Koyama, S., Tsutsui, T., Kuroda, S., Kimura, T. (2012) **Development of a new drug delivery system for uterus using bio-nanocapsule (BNC).** 13th International Symposium for Immunology of Reproduction Varna, Bulgaria 6.22-24/12
3. Masaki, H., Nakamura, H., Kumasawa, K., Koyama, S., Tsutsui, T., Hirano, K., Kimura, T. (2012) **Investigation of male reproduction on adipose triglyceride lipase (ATGL) deficiency mouse.** 13th International Symposium for Immunology of Reproduction. Varna, Bulgaria 6.22-24/12
4. 正木秀武、中村仁美、熊澤恵一、香山晋輔、筒井建紀、鈴木 朗、山口知是、平野賢一、木村 正 (2012) **Adipose triglyceride lipase(ATGL)欠損マウスにおける生殖能の検討**
第 137 回日本生殖医学会関西支部集談会 第 44 回関西アンドロロジーカンファレンス、大阪 3.3/12
5. 中村仁美、香山晋輔、熊澤恵一、瀧内 剛、正木秀武、藤森由香、後安聡子、筒井建紀、木村 正 (2012) **着床期子宮局所におけるマクロファージの体外での再構築**
第 64 回日本産科婦人科学会、神戸 4.13-15/12
6. 筒井建紀、熊澤恵一、中村仁美、大八木知史、正木秀武、後安聡子、藤森由香、朝倉寛之、木村 正. (2012) **子宮鏡下手術後に Asherman 症候群を認めた 2 症例**
第 57 回日本生殖医学会 長崎 11.8-9/12
7. 中村仁美、正木秀武、藤森由香、熊澤恵一、大八木知史、筒井建紀、木村 正 (2012) **着床期子宮局所におけるマクロファージの体外での再構築**
第 57 回日本生殖医学会 長崎 11.8-9/12
8. 正木秀武、中村仁美、熊澤恵一、藤森由香、後安聡子、筒井建紀、木村 正 (2012) **中鎖脂肪酸食により改善された、Adipose triglyceride lipase (ATGL)欠損マウスの生殖能、**
第 57 回日本生殖医学会 長崎 11.8-9/12
9. 大八木知史、筒井建紀、熊澤恵一、橋本香映、中村仁美、正木秀武、藤森由香、後安聡子、坂田正博、木村 正 (2012) **当院における子宮体癌・子宮内膜異型増殖症症例**

に対する不妊治療についての検討

- 第 57 回日本生殖医学会 長崎 11.8-9/12
10. 田畑知沙、筒井建紀、林 正美、**中村仁美**、大八木知史、若林敦子、瀧内 剛、正木秀武、筒井建紀、香山晋輔、木村 正 (2011) **不育症に対する抗血小板療法/抗凝固療法に関するアンケート調査**
第 136 回日本生殖医学会関西支部集団会
第 42 回関西アンドロロジーカンファレンス, 大阪 3.5/11
11. **Nakamura, H.**, Koyama, S. Tabata, C. Thang, N. Takiuchi, T. Masaki, H. Tsutsui, T. Kimura, T. (2011) **Development of a new drug delivery system for uterus using bionanocapsule(BNC)**
第 63 回日本産科婦人科学会
大阪 8.29-31/11
12. 筒井建紀、正木秀武、香山晋輔、田畑知沙、熊澤恵一、**中村仁美**、木村 正 (2011) **不育症治療としての抗血小板療法・抗凝固療法に関するアンケート調査**
第 26 回日本生殖免疫学会
名古屋 12.2-3/11
13. 正木秀武、筒井建紀、**中村仁美**、香山晋輔、田畑知沙、熊澤恵一、後安聡子、藤森由香、木村 正 (2011) **不育症に対する抗血小板療法・抗凝固療法に関するアンケート調査の解析** 第 56 回日本生殖医学会
横浜 12.7-9/11

[その他]

Nakamura, H.

The 63rd Annual congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology.

IS Award

Development of a new drug delivery system for uterine using bio-nanocapsule (BNC).

August 29-31, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村仁美 (NAKAMURA HITOMI)
大阪大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：80467571

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：